

Thesis TUBINGEN 1966
Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. F. Lembeck

Abbau von Beta-Carotin
durch Lebermikrosomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Beisenherz
aus Schwäb. Hall

1966

8480

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. F. Lembeck

Abbau von Beta-Carotin
durch Lebermikrosomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Beisenherz
aus Schwäb. Hall

1966

Dekan:

Professor Dr. W. Schneider

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Uehleke

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lembeck

INHALTSVERZEICHNIS
=====

	Seite
A. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	2
B. GANG DER VERSUCHE UND IHRE ERGEBNISSE	8
1. Versuche mit dem Udenfriend-System	8
2. Abbau von β -Carotin durch Lebermikrosomen	8
C. METHODEN	13
1. Darstellung von β -Carotin	13
2. Synthese von Retinen	14
3. Herstellung von aktivem Mangandioxyd	14
4. Modellsystem für Oxydationen nach Udenfriend..	15
5. Präparation von Lebermikrosomen	16
6. TPNH-System	17
7. Mikrosomenansätze	18
8. Kontrollversuche	18
9. Säulenchromatographie	20
10. Dünnschichtchromatographie	20
11. Anfärbereagenzien	24
D. ZUSAMMENFASSUNG	25
E. SCHRIFTTUM	26

A. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

=====

Carotinoide sind im Pflanzenreich außerordentlich weit verbreitet. Chemisch handelt es sich um ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die aus Isopreneinheiten aufgebaut und als Polyisoprenoide mit den Terpenen verwandt sind. Von diesen außerordentlich stark gefärbten Verbindungen besitzt das β -Carotin als Provitamin A besondere biologische Bedeutung. Aber grundsätzlich sind alle Carotinoide, die einen intakten β -Jononring enthalten, als Provitamin wirksam. Die spezifische Wirkung des Vitamin A ist an den β -Jononring, fünf konjugierte Doppelbindungen und die hydrophile Endgruppe gebunden.

Die Summenformel des β -Carotins $-C_{40}H_{56}-$ stellte 1907 WILLSTÄTTER (1) auf, und die richtige Strukturformel wurde 1930 von KARRER (2) postuliert und bewiesen (3). Durch Ozonabbau von Vitamin A und durch andere Reaktionen wurde gezeigt, daß Vitamin A dasselbe Kohlenstoffringsystem wie β -Carotin und β -Jonon enthält (4), und daß Vitamin A chemisch direkt durch symmetrische Spaltung von β -Carotin entstehen kann. (Vgl. Formeln S. 7)

Bei Vitamin A-Mangel entstehen typische Erscheinungen wie Wachstumsstörungen und Veränderungen des Epithels. Ganz allgemein treten Veränderungen der Haut und Schleimhäute im Sinne einer Verhornung auf. Durch diese Schädigung der Epithelzellen werden auch die Drüsen betroffen. Am deutlichsten zeigt sich das an der Tränendrüse. Es kommt zur Austrocknung von Hornhaut und Bindehaut, zu Hemeralopie und Keratomalazie.

Carotine gelangen mit der Nahrung in den tierischen Körper, und man findet sie dort besonders im Körperfett, in der Milch, in der Nebenniere, im Corpus luteum, in der Retina und im Serum. MOORE (5) bewies in den Jahren 1929 bis 1931 durch Gaben von β -Carotin an Vitamin A-frei ernährte Tiere, daß die Mangelsymptome verschwinden, also β -Carotin im Organismus zu Vitamin A umgewandelt wird.

Über den Angriffspunkt und die Wirkungsweise des Vitamin A ist bisher sehr wenig bekannt. Genauere Kenntnisse hat man nur über die Rolle des Vitamin A-Aldehyds - des Retinens - beim Sehvorgang. Der dunkelrote Farbstoff der Netzhaut, das Rhodopsin, ist eine Verbindung des Retinens (Vitamin A-Aldehyd) mit dem Lipoproteid Opsin. Bei Belichtung wird das Rhodopsin in seine Bestandteile Retinen und Opsin gespalten und regeneriert bei Dunkelheit wieder. WALD (6). Über Chemie und Biologie der Carotine gibt es eine Reihe von Zusammenfassungen und Monographien, auf die hier verwiesen werden soll (7-12).

Vitamin A-Mangelsymptome konnten durch β -Carotingaben geheilt werden, aber man wußte auch, daß β -Carotin selber unwirksam ist und erst durch Spaltung in die wirksame Form des eigentlichen Vitamins übergeht. Hier tauchte nun die Frage nach dem Mechanismus der Umwandlung auf. Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten für die Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A: Einmal könnte die Polyenkette durch oxydative Spaltung der mittleren Doppelbindung (15,15') in zwei Moleküle Vitamin verwandelt werden und dabei primär der Alkohol, der Aldehyd oder die Säure entstehen. Andererseits ist stufenweiser Abbau von einem Ende her denkbar, also oxydativer Angriff an einem Jononring. Es hat nicht an Experimenten gefehlt, die dieses Problem zu lösen versuchten.

KUHN und BROCKMANN (13) fanden nach Oxydation des β -Carotins mit Chromsäure eine Verbindung, die sie β -Oxy-carotin nannten. Diese besaß noch 40 C-Atome, die intakten β -Jononringe und damit auch die Vitamin A-Wirksamkeit. Durch starke Oxydation mit Osmiumtetroxyd erhielten KUHN und BROCKMANN β -Carotanon, in dem die Jononringe geöffnet sind und das auch keine Vitaminwirksamkeit besitzt. Durch schrittweise Oxydation von β -Carotin erhält man Derivate von Azaphrin ($C_{27}H_{38}O_4$), einer natürlich vorkommenden Carotinoidcarbonsäure (14). KARRER und Mitarbeiter (15) verwendeten Kaliumpermanganat zur Oxydation und erhielten β -Apo-2'-carotinal und β -Apo-4'-carotinal als erste Verbindungen der β -Carotinalreihe. (Vgl. Formeln S. 7). HUNTER und WILLIAMS (16) erreichten bei der Oxydation von β -Carotin mit Wasserstoffperoxyd eine geringe Umwandlung zu Vitamin A-Aldehyd.

MEUNIER und Mitarbeiter (17) konnten Retinen in weit größerer Ausbeute durch Oxydation mit Mangandioxyd herstellen. Durch Oxydation mit Wasserstoffperoxyd in Anwesenheit von Osmiumtetroxyd kamen WENDLER und Mitarbeiter (18) zu drei Abbauprodukten des β -Carotins: Retinen (C_{20}), β -Jonylidenacetaldehyd (C_{15}) und 2,7-Dimethyloctatriendial (C_{10}). (s. Formeln S. 7)

Über die Spaltung von β -Carotin im Organismus liegen zahlreiche Untersuchungen vor, deren Ergebnisse sich aber teilweise widersprechen. OLCOTT und McCANN (19) glaubten schon 1931, daß in der Leber ein Enzym "Carotinase" vorkäme, das β -Carotin in Vitamin A umwandelt. Aber trotz verbesserter Methoden konnten WOOLF und MOORE (20) diese Angaben nicht bestätigen. Auch andere Autoren (21-22) fanden Anhaltspunkte, daß β -Carotin in der Leber zu Vitamin A umgewandelt wird. Dem stehen Versuche mit Leberpräparationen in vitro gegenüber, bei denen weder Retinen noch Vitamin A gefunden wurden (23-24). In den Jahren bis 1946 wurde allgemein angenommen, daß hauptsächlich die Leber β -Carotin in Vitamin A umwandelt. SEXTON et al. (25) bezweifelten als erste diese Vorstellung. Sie konnten zeigen, daß injiziertes β -Carotin zwar in der Leber gespeichert wird, fanden aber keine Beweise für die Umwandlung zu Vitamin A in diesem Organ.

Durch verschiedene Arbeiten ergaben sich Hinweise, daß die Schleimhaut des Dünndarms β -Carotin zu Vitamin A umbaut (26-29). GLOVER, GOODWIN und MORTON (30) beobachteten, daß der Abtransport des gebildeten Vitamins aus dem Dünndarm sehr schnell erfolgt, sodaß aus diesem Grunde in früheren Versuchen wahrscheinlich kein Vitamin A im Dünndarm gefunden wurde. Die Arbeiten von THOMPSON (31-32) brachten weitere Beweise, daß β -Carotin im Dünndarm umgewandelt wird. THOMPSON fütterte Vitamin A-frei ernährte~~n~~ Ratten mit β -Carotin und fand im oberen Viertel des Dünndarms eine "ansehnliche" Menge Carotinol (Vitamin A-Alkohol). Auch OLSON (33) konnte durch Versuche mit ^{14}C -markiertem β -Carotin die Umwandlung im Dünndarm beweisen. Er fand Vitamin A-Ester, -Alkohol und -Säure, außerdem wenig Retinen.

GLOVER, GOODWIN und MORTON (34) vermuteten zuerst eine zentrale Spaltung von β -Carotin, bei der primär der Aldehyd entsteht. Später schlugen GLOVER und Mitarbeiter (35-36) jedoch einen Abbau vor, der mit β -Oxydation der Doppelbindung eines Jononringes terminal beginnt und über die β -Carotinale zu Vitamin A führen soll.

BRÜGGEMANN und NIESAR (37) schlossen aus ihren Versuchen an Schnitten von Kuheutern, daß aus einem Molekül β -Carotin zwei Moleküle Carotinol entstehen. SIBBALD und HUTCHINSON (38) dagegen erhielten bei der Umwandlung von β -Carotin durch Dünndarm von Küken Ergebnisse, die sich nur als terminale Oxydation deuten ließen. Auch HARASHIMA (39) schließt aus der Kinetik der Aufnahme von β -Carotin und dem Sauerstoffverbrauch bei Inkubation mit Dünndarmschnitten auf Oxydation vom Molekülende her.

Ohne Zweifel wird β -Carotin im Darm zu Vitamin A umgewandelt. Jedoch gibt es eine Reihe von Argumenten für eine Beteiligung der Leber. Da diese reich an Alkoholdehydrogenasen ist, die Carotinole und Carotinale schnell zur entsprechenden Säure oxydieren (40-42), ist es verständlich, daß in der Leber früher kein Retinen oder ein anderer Aldehyd der Carotinalreihe gefunden wurde. Mit verbesserter Technik der Dünnschichtchromatographie konnten WINTERSTEIN und HEGEDÜS (44) nachweisen, daß Retinen in geringen Mengen auch in der Leber vorkommt. (Rind: bis 2 mg/kg Leber)

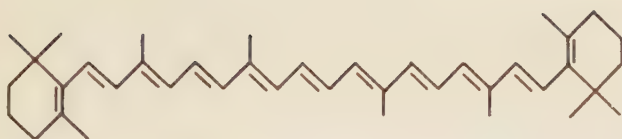
Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die biologische Isomerisierung von Lycopin zu β -Carotin (DECKER und UEHLEKE, 43) wurden orientierende Versuche mit isolierten Lebermikrosomen und ^{14}C -6,6'-markiertem β -Carotin unternommen (UEHLEKE, 1958). Beim Aufarbeiten dieser Ansätze wurde nach säulenchromatographischer Trennung in den Aldehydfractionen Radioaktivität gefunden. Jedoch gelang damals durch Säulenchromatographie eine saubere Auftrennung der verschiedenen Aldehyde nicht.

BRODIE und Mitarbeiter (45-46) haben entdeckt, daß Enzymsysteme in Lebermikrosomen körperfremde Verbindungen oxydieren. Besonders lipoidlösliche (schlecht wasserlösliche) Verbindungen werden von diesem recht unspezifischen System oxydativ umgewandelt und dadurch besser wasserlöslich und ausscheidungsfähig gemacht.

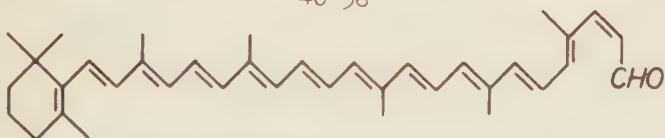
Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob das endoplasmatische Retikulum der Leber (Mikrosomenfraktion) bei der oxydativen Spaltung von β -Carotin im Organismus beteiligt ist.

Als diese Versuche bereits begonnen waren, erschien eine Mitteilung von ZACHMANN und OLSON (47). Darin wurde gezeigt, daß in isoliert durchströmten Rattenlebern Vitamin A-Ester entstehen, wenn der Durchströmungsflüssigkeit ^{14}C - β -Carotin zugefügt wurde. Außerdem haben auch diese Autoren nach säulenchromatographischer Trennung in der Fraktion des Retinens und anderer Abbauprodukte Radioaktivität gefunden.

UDENFRIEND et al. (48-49) erkannten, daß ein System aus Fe^{++} -Ionen, Ascorbinsäure, einem Komplexbildner (Äthylendiamintetraessigsäure, EDTA) und molekularem Sauerstoff viele Substanzen oxydiert, die auch biologisch von dem Mikrosomensystem umgesetzt werden. Bevor wir Versuche zur Oxydation von β -Carotin durch Lebermikrosomen durchführten, haben wir deshalb mit diesem Modellsystem geprüft, ob β -Carotin oxydiert wird.



β -Carotin $C_{40}H_{56}$



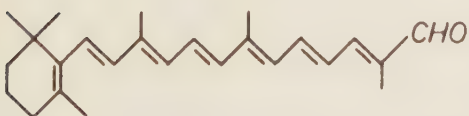
β -Apo-2'-carotinal $C_{37}H_{48}O$



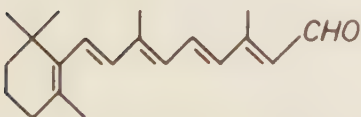
β -Apo-4'-carotinal $C_{35}H_{46}O$



β -Apo-8'-carotinal $C_{30}H_{40}O$



β -Apo-12'-carotinal $C_{25}H_{34}O$



Vitamin A-Aldehyd, Retinen $C_{20}H_{28}O$



β -Jonylidenacetaldehyd $C_{15}H_{22}O$

B. GANG DER VERSUCHE UND IHRE ERGEBNISSE

1. Udenfriend-System

β -Carotin wurde, in Aceton gelöst, mit dem Hydroxylierungssystem nach UDENFRIEND (48) unter Sauerstoff bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, mit Petroläther extrahiert, eingeengt und auf Dünnschichtplatten chromatographiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde nur β -Carotin und keine Oxydationsprodukte wiedergefunden. Auch nach verschiedenen Abänderungen des Systems hinsichtlich der Lösungsmittel für Carotin (Dimethylformamid, Tween 20 und Tween 80) der Konzentration von β -Carotin, des pH (5,5 bis 7,4) wurden keine Bruchstücke gefunden.

2. Lebermikrosomen

a) Um den Umsatz des β -Carotins in Ansätzen mit Lebermikrosomen zu ermitteln, wurde β -Carotin (5 $\mu\text{g/ml}$) mit intakten und hitzeinaktivierten Mikrosomen inkubiert (s. S. 9). Während der Inkubation wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, mit Petroläther extrahiert (s. S. 18) und die Extinktion bei 450 m μ gemessen. Die Konzentration von β -Carotin nahm in den Ansätzen mit Mikrosomen und TPNH unter Sauerstoff von 1,384 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,306 $\mu\text{g/ml}$ ab, in Ansätzen mit hitzedenaturierten Mikrosomen dagegen nur auf 0,855 $\mu\text{g/ml}$. (Abb. 1) In Ansätzen ohne TPNH nahm β -Carotin ähnlich langsam ab.

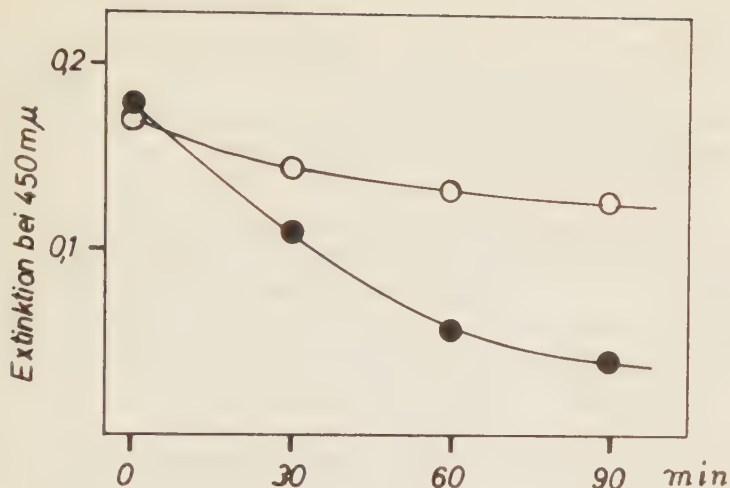


Abb. 1. Abnahme von β -Carotin in Suspensionen von gewaschenen Lebermikrosomen der Ratte. Ansätze: 2,0 ml Mikrosomensuspension (25-30 mg Protein), 2,0 ml TPNH-System und 50 μ g gelöstes β -Carotin, Vol. mit Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung pH 7,4 auf 100 ml ergänzt. Bei 37°C unter Luft inkubiert. Je 2,0 ml der Ansätze wurden mit 2,0 ml Petroläther extrahiert und die Extinktionen bei 450 m μ gemessen. (Schichtdicke 10 mm) Mittelwerte aus 4 Versuchen.

b) Von den Ansätzen mit Mikrosomen und TPNH, die bei 37°C unter Luft inkubiert waren, wurden Teile mit Petroläther extrahiert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf entstandene Abbauprodukte untersucht. Nach Entwicklung der Kieselgelplatten mit einer Mischung aus Petroläther, Benzol und Methanol wurde mit Rhodanin angesprüht. Erstmals nach 15 Minuten Inkubation erschien dabei ein gelb-oranger Fleck, der etwas schneller wanderte als Retinen und sich auch erheblich in der Farbe

von dem rot-violetten Retinen-Rhodanin-Komplex unterschied. Nach Verhalten und Farbe mußte dies ein anderer Aldehyd sein. (Methoden s. S. 21')

In Extrakten von Ansätzen ohne TPNH-regenerierendes System ergaben sich nach Besprühen mit Rhodanin keine gefärbten Flecken. Bei Ansätzen mit abgekochten Mikrosomen erschien ebenfalls keine Substanz, die mit Rhodanin reagierte.

Zur besseren Identifizierung der entstandenen Aldehyde wurde jetzt auf paraffingetränkten Kieselgelplatten chromatographiert. Der Vergleich mit synthetischem Retinen und verschiedenen Carotinolen (C_{15} , C_{20} , C_{25} , C_{30} , C_{35} , C_{37}) zeigte, daß sich das Umsetzungsprodukt nach R_f -Wert und Anfärbbarkeit mit Rhodanin wie Jonylidenacetaldehyd verhielt.

Nach Auskratzen und Chloroform-Extraktion der mit Rhodanin angefärbten Flecken von Jonylidenacetaldehyd und durch Vergleich mit bekannten Mengen, die auf der gleichen Platte mitliefen, ergab sich anhand der Absorption des Komplexes bei 295 m μ , daß in den Ansätzen von 10 ml mit 50 μ g β -Carotin während 90 Minuten ungefähr 15 μ g β -Carotin zu 3 μ g Jonylidenacetaldehyd umgesetzt wurden (Abb. 2).

Da bei den Versuchen von WENDLER et al. (18) ebenfalls Jonylidenacetaldehyd entstanden war, außerdem aber auch 2,7-Dimethyloctatriendial, versuchten wir, dieses Bruchstück nachzuweisen, was aber nicht gelang. Die dabei angewandten Methoden entsprachen denen beim Nachweis des C_{15} -Aldehyds.

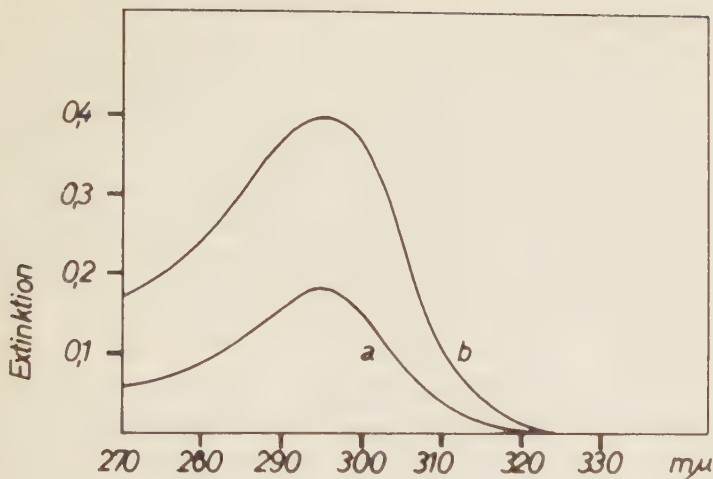


Abb. 2. Kurve a: Lichtabsorption eines mit 2,0 ml Chloroform aus dem Dünnschichtchromatogramm eluierten Fleckens von 1 μg synthetischem C_{15} -Aldehyd nach der Rhodanin-Reaktion. $S = 10$ mm.

Kurve b: Lichtabsorption eines Fleckens mit Farbe und R_f -Wert vom C_{15} -Aldehyd nach Dünnschichtchromatographie von Extrakten aus Mikrosomenansätzen mit β -Carotin.

c) Auf den entwickelten Chromatogrammen der Extrakte von Ansätzen aus β -Carotin und Lebermikrosomen zeigten sich außer dem C_{15} -Aldehyd noch fünf weitere Flecken, von denen keiner die Rhodanin-Reaktion gab. Ein immer an gleicher Stelle gefundener rosa Fleck lag seiner Wanderungsgeschwindigkeit nach zwischen Retinen und Jonylidenacetaldehyd. Die Konzentration dieser Substanz war so gering, daß sie nicht näher identifiziert werden konnte. Die übrigen Flecken gaben weder die Aldehydreaktion, noch ließen sie sich mit dem Carr-Price-Reagenz anfärben. Demnach waren es nicht

Vitamin A-Säure oder -Alkohol.

Da sich bei den Versuchen nie der Aldehyd des Vitamin A (Retinen) nachweisen ließ, wurde bei einigen Versuchen anstatt des β -Carotins die gleiche Menge Retinen eingesetzt, um zu sehen, ob das Retinen umgesetzt wird und welche Substanzen dabei entstehen. Nach der Dünnschichtchromatographie traten Flecke auf, die die Rhodanin-Reaktion gaben, bei einem Vergleich mit Retinen sich aber als verschieden von diesem erwiesen. Ein Vergleich mit Jonylidenacetaldehyd ergab, daß auch bei diesen Versuchen der C_{15} -Aldehyd entstanden war. Retinen wurde so schnell umgesetzt, daß es nach einer Inkubation von 10 Minuten nicht mehr nachzuweisen war.

Die Mikrosomenansätze wurden anfangs mit Petroläther eluiert. Vitamin A-Alkohol und -Säure lösen sich darin aber nicht besonders gut. Aus diesem Grunde wurde bei anderen Versuchen nach der Inkubation mit Chloroform extrahiert. Der gereinigte und getrocknete Extrakt wurde zusammen mit Vitamin A-Alkohol und -Säure auf eine normale Kieselgelplatte aufgetragen und nach Entwicklung mit Carr-Price-Reagenz besprüht. Es wurden vier Flecken sichtbar, die braun und blau-grau gefärbt waren, aber keiner besaß die Eigenschaften der beiden Vergleichssubstanzen. Die violett-rosa gefärbte Vitamin A-Säure wanderte wesentlich langsamer als der grau-blau gefärbte Alkohol. Auch hier war Jonylidenacetaldehyd entstanden. Er färbte sich bei der $SbCl_3$ -Reaktion zuerst orange-rosa, wurde aber nach zehnminütigem Erhitzen ($100^\circ C$) violett.

C. METHODEN

=====

β -Carotin und die verwendeten Apo-carotinale wurden uns freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Triphosphorpyridinnucleotid (TPN), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurden von der Firma Boehringer Söhne GmbH, Mannheim, bezogen. Zur Säulenchromatographie wurde Aluminiumoxyd Woelm, neutral, Aktivitätsstufe I und zur Dünnschichtchromatographie "Kieselgel G nach Stahl" der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet. Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) "Idranal" stammte von der Firma Riedel De Haën, Seelze-Hannover. Zum Anfärben der Aldehyde wurde Rhodamin der Fluka AG, Buchs (St. Gallen) benutzt. Als Ionenaustauscher diente Lewatitt S 100 Bayer, Leverkusen. Petroläther (Kp. 40-60°C) wurde vor der Verwendung über eine Säule von 3,5 cm Durchmesser und 20 cm Länge gereinigt, die halb mit Kieselgel und halb mit Aluminiumoxyd gefüllt war. Um das Chloroform für die Carr-Price-Reaktion alkoholfrei zu machen, wurde es ebenfalls über eine Säule geschickt, die Al_2O_3 Aktivitätsstufe I enthielt. Die Absorptionsspektren wurden im automatisch schreibenden Spektralphotometer DK 2 von Beckmann ermittelt, die Extinktionen im Zeiss-Gerät PMQ₂ gemessen.

1. Darstellung von β -Carotin

Zu den ersten Versuchen wurde β -Carotin aus Kresseblättern hergestellt. Von 100 g Kresse wurden die Stiele entfernt und die Blätter mit einer Mischung aus Petroläther und Aceton (Verhältnis 1 : 1) im Mörser mit etwas Sand zerrieben. Das Lösungsmittel wurde durch ein Filter abgossen. Im ganzen wurde viermal extrahiert. Um das Aceton zu entfernen, wurde der Extrakt dreimal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. An einer Säule (3,5 cm Durchmesser, 20 cm Länge) wurde durch mehrmaliges Chromatographieren die carotinhaltige Schicht abgetrennt und auf 2 ml eingeengt. Durch Messung der Extinktion bei 450 m μ und Um-

rechnung ergab sich ein Gehalt an β -Carotin von 115 $\mu\text{g/ml}$.
 β -Carotin: $450 \text{ m}\mu [\text{E}] \frac{1\%}{10 \text{ mm}} = 260 \text{ (Hexan)}$

2. Synthese von Retinen

Retinen wurde nach MEUNIER et al. (17) hergestellt. 100 mg β -Carotin wurden in einer Lösung aus 100 ml Äther, 3 ml absolutem Alkohol und 10 g Mangandioxyd unter Luftzutritt und in der Dunkelheit geschüttelt. Dabei trat der Farbumschlag von rot nach gelb, der die Umwandlung von Carotin in Retinen anzeigt, nicht ein. β -Carotin wurde daraufhin nicht mehr in Äther und Äthanol sondern in Petroläther und Aceton gelöst. Außerdem wurde aktiviertes Mangandioxyd verwendet, das nach ATTENBURROW (50) gewonnen wurde.

3. Herstellung von aktivem Mangandioxyd

11,1 g Mangansulfat wurden in 15 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde während einer Stunde gleichzeitig mit 11,7 ml NaOH (40 %) unter Rühren in eine heiße Lösung aus 19,6 g KMnO_4 in 60 ml Wasser eingetropft und eine weitere Stunde gerührt. Die erkaltete Lösung wurde zentrifugiert und der Niederschlag mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser farblos war und dann kurz bei $100\text{--}120^\circ\text{C}$ getrocknet. (Nicht länger als 30 Minuten trocknen, da sonst das MnO_2 wieder in eine inaktive Form übergeht). 10 mg β -Carotin, 20 ml Petroläther und 0,5 ml Aceton wurden nun zusammen mit 1 g aktiviertem MnO_2 unter leichtem Erwärmen 10–15 Minuten gerührt, wobei der Farbwechsel von rot nach gelb eintrat. Die Lösung wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Dann wurde der Rückstand in wenig Petroläther aufgenommen und auf eine Säule aus Aluminiumoxyd gegeben. Es wurde solange mit Petroläther eluiert, bis das nichtumgesetzte Carotin durchgelaufen war. Dann wurde mit 2 % Aceton in Petroläther eluiert. Dabei bildeten sich vier Zonen aus, die in folgender Reihenfolge durch die Säule wanderten: zwei dunkelgelbe, eine hellgelbe und eine rosa Zone. Die hellgelbe Fraktion wurde getrennt aufgefangen und mittels Dünnschichtchromatographie auf Reinheit geprüft.

Nach dreimaliger Säulenchromatographie zeigte sich im Dünnschichtchromatogramm nur noch ein Fleck, der nach Besprühen mit Rhodanin und Ammoniaklösung (Vgl. S 24) die Aldehydreaktion gab. Die gereinigte Fraktion zeigte ein Absorptionsmaximum bei 396 m/ μ in Petroläther.

SbCl₃-Blaureaktion: $\lambda_{\max}$ m/ μ [E] $\frac{1\%}{10\text{mm}}$ 664 (CHCl₃). F=62 (51)

4. Modellsystem für Oxydationen nach UDENFRIEND (48)

Im Ansatz von 50 ml Gesamtvolumen waren folgende Substanzen enthalten, die in aufgeführter Reihenfolge zugefügt wurden:

20 μ Mole β -Carotin	= 11,26 mg
40 μ Mole EDTA (als Di-Natriumsalz)	= 11,86 mg
400 μ Mole Ascorbinsäure	= 70,40 mg
20 μ Mole FeSO ₄ x 7 H ₂ O	= 5,56 mg

Die Substanzen wurden in zehnfacher Konzentration in Phosphatpuffer gelöst (s. Mikrosomenversuche) und entsprechende Volumina verwendet. Das Volumen wurde mit Phosphatpuffer pH 7,4 auf 50 ml ergänzt.

Andere Ansätze enthielten anstatt 20 μ Mole nur 5 μ Mole = 2,81 mg β -Carotin.

0,1 M Phosphatpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (gelöst in Aqua dest.)	= 17,8 g
1-n HCl	= 20,0 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Krebs-Ringer-Lösung: NaCl 9,0 g, KCl 0,46 g, KH₂PO₄ 0,21 g
MgSO₄ x 7 H₂O 0,382 g, Wasser ad 1000 ml

Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung: Drei Teile Krebs-Ringer-Lösung
und ein Teil Phosphatpuffer, pH 7,4.

Der pH-Wert wurde mit einer Glaselektrode auf 7,4 eingestellt.

Um β -Carotin in Lösung zu bringen, wurde wie folgt verfahren: Es wurde 1 mg abgewogen und in 2 ml Aceton gelöst ($\hat{=}$ 500 μ g/ml). Davon wurde 1 ml in 10 ml Krebs-Ringer-Phosphatlösung gebracht, der zuvor 0,05 ml Tween 80 zugegeben wurde und in einem kleinen Rundkolben geschüttelt. Das Aceton wurde im Vakuum wieder entfernt. Von dieser Lösung wurde 1 ml für den Versuch genommen. ($\hat{=}$ 50 μ g/ml). Die Verdünnung wurde jedesmal neu angesetzt.

5. Herstellung von Lebermikrosomen

Männliche Ratten (WISTAR) wurden durch Genickschlag getötet und ausgeblutet, die Lebern sofort herausgenommen, in Eis gelegt und dann von grobem Bindegewebe und Fett befreit. Alle folgenden Arbeitgänge wurden im Kühlraum bei 0-2°C durchgeführt. Ein Gewichtsteil Leber wurde mit zwei Teilen Phosphatpuffer (pH 7,4) kurze Zeit mit einem Homogenisator (Ultraturrax) zerkleinert. Darauf wurde der entstandene Brei in einem Glashomogenisator eine Minute bei etwa 1200 U/Min. zerrieben. Dieses Homogenat wurde fünf Minuten bei 2000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde durch mehrere Lagen Gaze filtriert und zwanzig Minuten bei 9000xg zentrifugiert. Die gelblichweiße Fettschicht auf dem Überstand wurde mit einer Kapillare vorsichtig abgesogen. Das Zentrifugat enthält die größeren Bestandteile wie Mitochondrien und Zellbruchstücke. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde möglichst rasch gearbeitet, weil die Mikrosomen sonst an Aktivität verlieren.

Der Überstand wurde nun in der präparativen Ultrazentrifuge (Modell L von Spinco) eine Stunde lang bei 78000xg zentrifugiert und der klare Überstand verworfen.

Die Mikrosomenfraktion bildet in den Röhrchen eine durchsichtige, fleischfarbene, geleeartige Schicht. Die Zentrifugenröhrchen wurden vorsichtig mit etwa 10 ml Phosphatpuffer ausgespült, ohne die Mikrosomen aufzuwirbeln. Die Mikrosomenschicht wurde nun mit einem passenden Glaspistill zuerst mit wenig, dann mit mehr Pufferlösung angerührt. Es wurde mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer aufgefüllt und nochmal eine Stunde bei 78000xg zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen.

Die durchsichtige, fleischfarbene Mikrosomenfraktion wurde wie oben beschrieben mit Krebs-Ringer-Phosphat aufgeschlemmt und auf einige ml aufgefüllt. In dieser Form wurden die Mikrosomen den Versuchsansätzen beigegeben.

6. TPNH-System

Folgende Lösungen wurden angesetzt und im Kühlraum bei $+2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt:

1. Glucose-6-Phosphat:

100 $\mu\text{Mole/ml} \hat{=} 52,2 \text{ mg/ml in } \text{H}_2\text{O}$

Glucose-6-Phosphat lag als unlösliches Bariumsalz $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$ vor ($M = 522$); es wurde daher zuvor mit einem Ionenaustauscher (Lewatitt S 100 Bayer) in lösliche Form gebracht.

2. TPN

30 $\mu\text{Mole/ml} \hat{=} 25,2 \text{ mg/ml}$

TPN lag als Natriumsalz $\times 4 \text{ H}_2\text{O}$ vor ($M = 837$).

3. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die vorliegende Dehydrogenase mit etwa 300 Kornberg-Einheiten/5mg/ml wurde vor der Verwendung 1 : 10 mit $3\text{n}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung verdünnt.

Je 10 ml Ansatzvolumen wurden angesetzt:

50 $\mu\text{Mole Glucose-6-Phosphat}$	= 0,50 ml
3,6 $\mu\text{Mole TPN}$	= 0,12 ml
1,5 E Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	= 0,50 ml
gesamt	1,12 ml

Man bringt diese Lösung mit etwa 1 M NaOH bis etwa pH 7,4. Sie wurde nun mit Krebs-Ringer-Phosphat auf 2 ml ergänzt und entsprach so genau der Menge, die für 10 ml Ansatzvolumen bestimmt war. Das TPNH-System wurde im Kühlraum angesetzt und kurz vor Gebrauch auf 37°C angewärmt.

7. Mikrosomenansätze

In 10 ml Ansatzvolumen waren enthalten:

- | | |
|--|-------|
| 1. Mikrosomensuspension (25-30 mg Protein) | 2 ml |
| (Das entsprach der Mikrosomenmenge aus
10-12 g Rattenleber) | |
| 2. TPNH-System | 2 ml |
| 3. 50 μ g β -Carotin gelöst in | 1 ml |
| 4. Krebs-Ringer-Phosphatlösung ad | 10 ml |

Die Ansätze wurden im Wasserbad von 37°C unter Luft geschaukelt. Nach bestimmten Zeiten wurden 1-2 ml entnommen und mehrmals mit Petroläther extrahiert. Dabei bildete sich durch den Lösungsvermittler oft eine Emulsion, die sich sehr schwer trennte. Durch Zugabe von einigen Tropfen Methanol ließ sich die Mischung leicht herbeiführen. Man ließ die hellgelbe Schicht aus dem Schütteltrichter durch ein Filter laufen, trocknete über Natriumsulfat und filterte danach noch einmal ab. Stellt man von diesem Filtrat ein Dünnschichtchromatogramm her, so wandern mindestens drei Fettfraktionen mit und verwischen das gesamte Chromatogramm, sodaß sich kein Vergleich mit synthetischen Substanzen durchführen läßt. Das Filtrat blieb deshalb über nacht im Kühlraum bei -25°C stehen. Am Morgen wurden die ausgefrorenen Fette abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft und in wenigen ml Petroläther aufgenommen. Diese Lösung wurde durch mehrmalige Säulenchromatographie an Al_2O_3 aufgetrennt.

8. Kontrollversuche

Um zu ermitteln, mit welchen Verlusten bei der Aufarbeitung eines Versuchsansatzes zu rechnen war, wurde eine bekannte Menge Retinen (100 μ g) in gleicher Weise aufgelöst wie das Carotin bei den Mikrosomenansätzen und im gleichen Verhältnis mit Krebs-Ringer-Lösung versetzt. Dann wurde derselbe Extraktions- und Trenngang durchgeführt. Von der so erhaltenen Lösung (20 ml) wurde die Extinktion bei 369 m μ gemessen. Sie betrug 0,65.

Nach der Eichkurve von Retinen in Petroläther (Abb. 3) ergibt dies 3,5 $\mu\text{g/ml}$. In den 20 ml der Versuchslösung sind also noch 70 μg enthalten, d. h., daß beim vorliegenden Extraktions- und Trenngang 30 % verlorengehen, die Ausbeute lag bei 70 %.

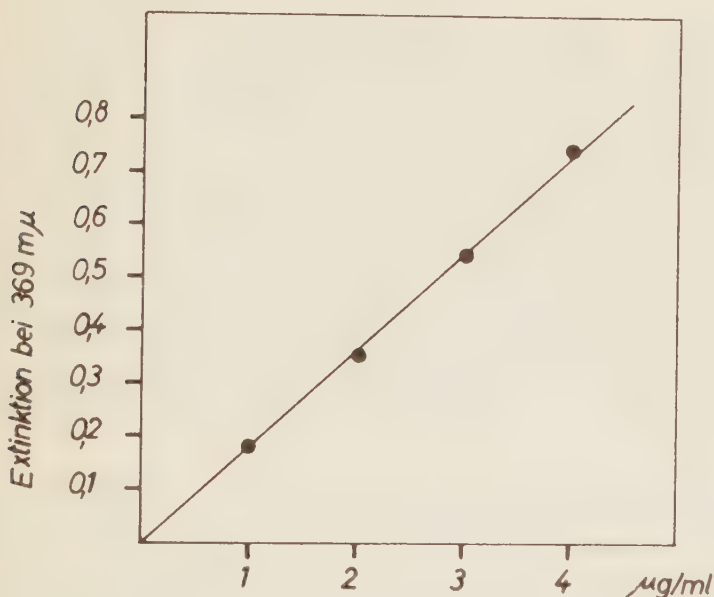


Abb. 3. Eichkurve von Retinen in Petroläther. Lösungen von verschiedenen Mengen Retinen in 10 ml Krebs-Ringer-Phosphat wurden viermal mit je 10 ml Petroläther extrahiert, der Petroläther auf 20 ml eingeeengt, über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und die Extinktionen bei 369 mμ in 10 mm Schichtdicke gemessen.

9. Säulenchromatographie

Bei der Reinigung des Retinens wurden verschiedene Säulenfüllungen erprobt, um die schärfste Trennung zu ermitteln. Durch Al_2O_3 neutral mit der Aktivitätsstufe I wandert Carotin nicht wenn mit reinem Petroläther entwickelt wird. Dies wird erst durch Zusatz von 2 % Aceton erreicht. Bei inaktiviertem Al_2O_3 wandert Carotin schon beim Entwickeln mit Petroläther, die anderen Fraktionen bei Zusatz von 1-5 % Aceton. Die Banden ziehen sich aber im Verlauf der Säule etwas auseinander und werden unscharf. Am besten bewährte sich inaktiviertes Al_2O_3 neutral und Na_2SO_4 sicc. im Verhältnis 1 : 1 (inaktiviertes Al_2O_3 s. u.). Durch Entwicklung mit 2 % Aceton in Petroläther erhält man sehr schmale und scharfe Banden. Al_2O_3 wurde inaktiviert, indem es mit Petroläther, der 10 % Wasser enthielt, geschüttelt wurde und in dieser Lösung einige Stunden stehenblieb. Dann wurde der Petroläther abgesaugt, das Aluminiumoxyd in einer dünnen Lage ausgebreitet und an der Luft getrocknet und in ein dichtes Glas gefüllt. Natriumsulfat sicc. wurde bei 150°C nachgetrocknet.

10. Dünnschichtchromatographie

Die Platten (200 x 200 mm) wurden mit einem Streichgerät (Degussa) in einer Schichtdicke von 0,25 mm belegt. Ein Teil Kieselgel G "Merck" wurde mit zwei Teilen Wasser gemischt. Die einzelnen Proben und Vergleichslösungen wurden beim qualitativen Aufarbeiten mit Kapillaren aufgetragen. Zuvor wurde die Kieselgelschicht in entsprechend viele Bahnen aufgeteilt. Wurden größere Mengen aufgetragen, so saugte sich der Kreis auf der Kieselgelschicht am Auftragspunkt bei jedem neuen Ansetzen immer weiter nach außen und konnte dabei so groß werden, daß beim Entwickeln ungleichmäßig laufende Streifen entstanden. Um dieses zu vermeiden, wurde das Lösungsmittel mit Hilfe einer Injektionsnadel, die über einen Schlauch mit einer Druckluftleitung verbunden und direkt neben der Kapillare auf die Platte gerichtet war, während des Auftragens rasch zum Verflüchtigen

gebracht. Als Laufmittel dienten 60 ml einer Mischung von Petroläther und Benzol im Verhältnis 1 : 1, die wechselnde Mengen Methanol enthielt (zwischen 0,5 und 1,5 ml).

WINTERSTEIN (44) hat auf das ungewöhnliche Adsorptionsverhalten der Carotinoidaldehyde hingewiesen. Auf einer normalen Kieselgelplatte läuft z. B. β -Apo8-carotinal schneller als das um 10 C-Atome ärmere Retinen. Es wurden deshalb auch mit Paraffin imprägnierte Kieselgelplatten zur Dünnschichtchromatographie verwendet, auf denen die Adsorptionsaffinitäten von der Zahl der Doppelbindungen abhängen. Auf solchen Platten wurde der Petrolätherextrakt eines Ansatzes aus Mikrosomen, TPNH-System und β -Carotin aufgetragen (Abb. 6). Hier lassen sich die einzelnen Aldehyde sehr gut unterscheiden. Der Jonylidenacetaldehyd zeigt hier auch nur noch einen Fleck. Nichtumgesetztes β -Carotin wandert auf der normalen Kieselgelplatte bei den verwendeten Laufmitteln mit der Front, bei der paraffinimprägnierten Platte bleibt es am Startpunkt zurück. (Abb. 4-6)

Paraffinimprägnierte Platten wurden nach WINTERSTEIN (44) hergestellt: Eine Kieselgelplatte (G) wurde für zwei Minuten in Petroläther gelegt, der 5 % Paraffinum liquidum DAB enthielt, kurz an der Luft und dann 10 Minuten im Trockenschrank bei 120°C getrocknet. Das Laufmittel für diese Platte war mit Paraffin gesättigtes Methanol. Um nicht jedesmal eine Stunde Laufzeit abwarten zu müssen, wurden orientierende Versuche auf Objektträgern (75 x 25 mm) durchgeführt, nach Angaben von WASICKY (52). Die Objektträger wurden zum Bestreichen mit den Schmalseiten hintereinander auf eine Unterlage an eine Kante gelegt, wie sie beim Bestreichen der großen Platten verwendet wird. Als Kammer zum Entwickeln wurden Färbetanks für histologische Zwecke verwendet. Es lassen sich damit in einem Glasbehälter sieben verschiedene Chromatogramme entwickeln. Die Laufzeit betrug etwa zehn Minuten.

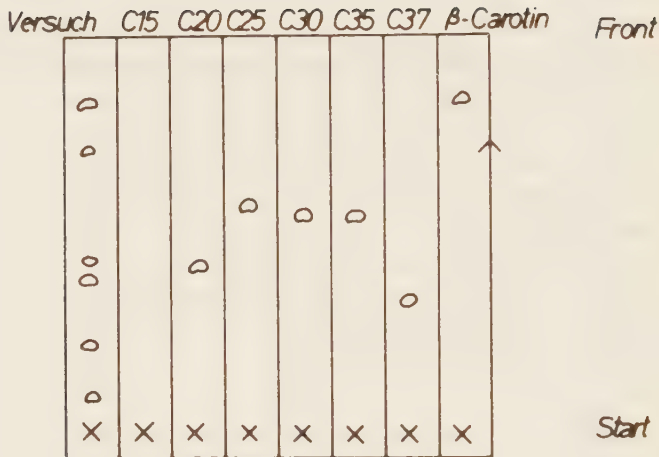


Abb. 4. Dünnschichtchromatogramm von den Apocarotinalen C_{15} - C_{37} und β -Carotin in Reinsubstanz. Links ist der eingeeengte Extrakt eines Ansatzes aus Lebermikrosomen und β -Carotin aufgetragen. Kieselgel G (Merck), Petroläther: Benzol 1 : 1, Laufzeit 60 Minuten. Der C_{15} -Aldehyd ist ohne Anfärbung hier nicht sichtbar.

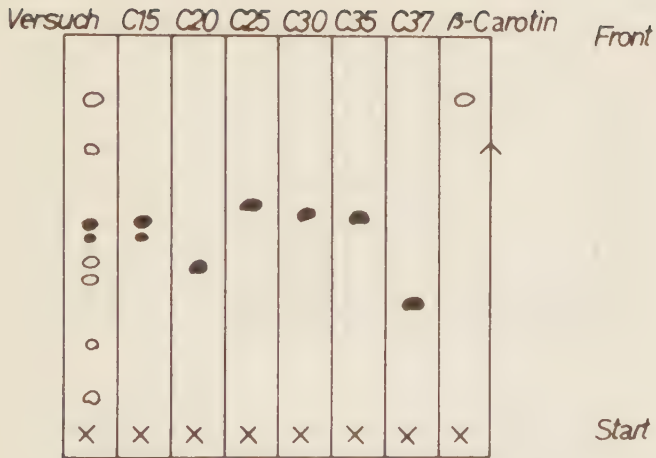


Abb. 5. Dünnschichtchromatogramm derselben Substanzen auf Kieselgelplatte nach Besprühen mit Rhodanin. Die hier schwarzen Flecken zeigten Reaktion mit Rhodanin.

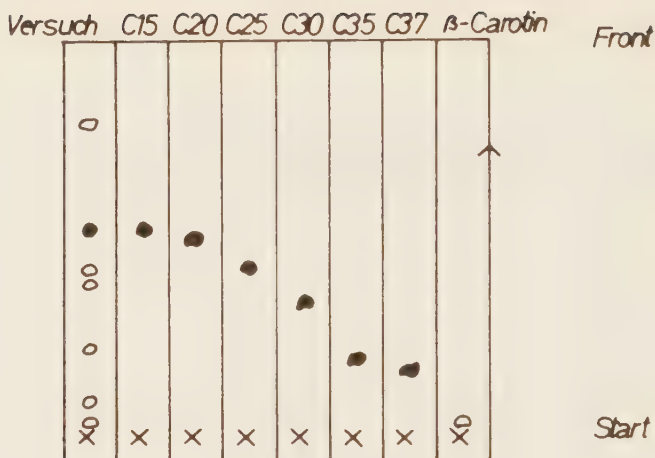


Abb. 6. Dünnschichtchromatogramm derselben Substanzen auf paraffinimprägnierter Platte nach der Rhodaninreaktion. (Laufmittel: paraffingesättigtes Methanol)

11. Anfärbereagenzien

Carr-Price-Reagenz: SbCl_3 wurde in Chloroform gelöst, das vorher alkoholfrei gemacht wurde, indem es durch eine Säule lief, die mit Al_2O_3 Aktivitätsstufe I gefüllt war. Für die ungefärbten Polyenaldehyde wurde Rhodanin verwendet (44). Das entwickelte Chromatogramm wurde mit einer 0,5 %igen alkoholischen Lösung von Rhodanin und darauf mit 25 %igem Ammoniak besprüht und im Heißluftstrom getrocknet. Dabei traten die Kondensationsprodukte des Rhodanins mit den Aldehyden in typischen Farben auf. Erfassungsgrenze: 0,02-0,03 μg .

D. ZUSAMMENFASSUNG

=====

β -Carotin muß im Körper umgewandelt werden, um biologisch als Vitamin A wirksam zu werden. Diese Oxydation erfolgt sicher im Darm, aber die Beteiligung der Leber ist ungewiß.

Der nähere Mechanismus der Umwandlung ist noch nicht bekannt. Manche Experimente sowie Hypothesen sprechen für eine zentrale Spaltung in zwei Moleküle Vitamin A, andere für eine stufenweise Oxydation von einem Ende her. Hierbei sollten die verschiedenen β -Apocarotinale auftreten.

Da der Vitamin A-Aldehyd (Retinen) in der Leber nachgewiesen wurde, bestand die Möglichkeit der Oxydation von β -Carotin auch in der Leber. Oxydative Umwandlungen - besonders von körperfremden Stoffen - werden durch Enzymsysteme im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen (Mikrosomenfraktion) katalysiert.

Ein aus Eisenionen, Ascorbinsäure und Sauerstoff bestehendes Modellsystem (UDENFRIEND), das viele biologische Hydroxylierungen nachahmt, oxydierte β -Carotin nicht zu C_{20} oder C_{15} Bruchstücken. Bei der Inkubation von β -Carotin mit isolierten Lebermikrosomen, TPNH und Sauerstoff wurde β -Carotin ziemlich schnell umgesetzt. Nach Säulen- und durch Dünnschichtchromatographie wurde Jonylidenacetaldehyd in größeren Konzentrationen gefunden. Andere Aldehyde und Vitamin A-Alkohol ließen sich nicht nachweisen. Inkubation von Retinen mit Mikrosomen und TPNH zeigte, daß Retinen selber schnell weiter umgesetzt wurde und ebenfalls Jonylidenacetaldehyd entstand.

E. SCHRIFTTUM

=====

1. WILLSTÄTTER, R., u. W. MIEG: Über die gelben Begleiter des Chlorophylls, Liebigs Ann. Chem. 355, 1 (1907).
2. KARRER, P., A. HELFENSTEIN, H. WEHRLI u. A. WETTSTEIN: Über die Konstitution des Lycopins und Carotins, Helv. chim. Acta 13, 1083 (1930).
3. KARRER, P., R. MORF, u. K. SCHÖPP: Zur Kenntnis des Vitamins A aus Fischtran, Helv. chim. Acta 14, 1431 (1931).
4. KARRER, P., R. MORF, u. K. SCHÖPP: Zur Kenntnis des Vitamins A aus Fischtran, Helv. chim. Acta 14, 1036 (1931).
5. MOORE, T.: The Absence of the Liveroil-Vitamin A from Carotene. A conversion of carotene to Vitamin A in vivo, Biochem. J. 24, 692 (1930).
6. WALD, G.: The Biochemistry of Vitamin A, Ann. Biochem. 22, 497 (1953).
7. PALMER, L. S.: Carotenoids and Related Pigments, Chemical Catalog Co. New York (1922).
8. ZECHMEISTER, L.: Carotinoide, Springer, Berlin (1934).
9. LEDERER, E.: Récherches sur les Caroténoides des Animaux inférieures, et les Cryptogames, Lons de Saunier, Paris (1937).
10. KARRER, P., u. E. JUCKER: Carotinoide, Birkhäuser, Basel (1948).
11. GOODWIN, T. W.: The comparative biochemistry of the carotenoids. Chapman and Hall, London (1952).
12. GOODWIN, T. W.: Carotenoids, their Comparative Biochemistry, Chem. Pub. Co., New York (1954).
13. KUHN, R., u. H. BROCKMANN: Über die ersten Oxydationsprodukte des β -Carotins, Ber. 65, 894 (1932); 66, 1319 (1933).
14. KUHN, R., u. H. BROCKMANN: Die Konstitution des β -Carotins, Ber. 67, 885 (1934).
15. KARRER, P., u. U. SOLMSEN: β -Carotinal, ein Abbauprodukt des β -Carotins, Helv. chim. Acta 20, 682 (1937).
16. HUNTER, R. F., u. N. E. WILLIAMS: Chemical conversion of β -Carotene into Vitamin A, J. chem. Soc. 1945, 554.

17. MEUNIER, P., J. JOUANNE TEAU, u. G. ZWINGELSTEIN: Sur la coupure oxydante du B-carotène en rétinène par MnO_2 , C. R. Acad. Sci. 231, 1170 (1950).
18. WENDLER, N. L., C. ROSENBLUM, u. M. TISHLER: The oxidation of B-carotene, J. am. chem. Soc. 72, 234 (1950).
19. OLCOTT, H. S., u. D. C. McCANN: Carotenase, The transformation of Carotene to Vitamin A in vitro, J. biol. Chem. 94, 185 (1931).
20. WOOLF, B., u. T. MOORE: Carotene and vitamin A, Lancet 223, 13 (1932).
21. von EULER, H., u. E. KLUSSMANN: Carotin und Vitamin A, Svensk Kem. Tidskr. 44, 223 (1932).
22. PARIENTE, A. C., u. E. P. RALLI: Presence of carotenase in the liver of the dog, Proc. Soc. exp. Biol. 29, 1209 (1931-32).
23. DRUMMOND, J. C., u. McWALTER: The biological relation between carotene and Vitamin A, Biochem. J. 27, 1342 (1933); J. Physiol. 83, 236 (1935).
24. BIERI, J. G., u. J. C. POLLARD: Conversion of carotene to vitamin A, Texas Rep. Biol. Med. 11, 402 (1953).
25. SEXTON, E. L., J. W. MEHL, u. H. J. DEUEL: The relative pro-vitamin A activities of carotene when introduced orally and parenterally in the rat, J. Nutr. 31, 299 (1946).
26. GOODWIN, T. W., u. R. A. MORTON: Determination of carotene and vitamin A in butter and margarine, Analyst 71, 15 (1946).
27. WIESE, C. E., J. W. MEHL, u. H. J. DEUEL: The in vitro conversion of carotene to vitamin A in the intestine of the rat, Arch. Biochem. 15, 75 (1947).
28. MATTSON, F. H., J. W. MEHL, u. H. J. DEUEL: The site of conversion of carotene to vitamin A in the rat, Arch. Biochem. 15, 65 (1947).
29. GOODWIN, T. W., u. R. A. GREGORY: Studies in Vitamin A-Carotenemetabolism in herbivores, Biochem. J. 43, 512 (1948).
30. GLOVER, J., T. W. GOODWIN, u. R. A. MORTON: Studies in Vitamin A. Conversion of B-Carotene into Vitamin A in the intestine of the rat, Biochem. J. 43, 512 (1947).
31. THOMPSON, S. Y., J. GANGULY, u. S. KON: Conversion of B-Carotene to vitamin A in the intestine, Brit. J. Nutr. 3, 50 (1950).

32. THOMPSON, S. Y., R. BRAUDE, M. E. COATES, A. T. COWIE, J. GANGULY, u. S. KON: Conversion of β -carotene to vitamin A in the intestine, Brit. J. Nutr. 4, 398 (1950).
33. OLSON, J. A.: The conversion of radioactive β -Carotene into Vitamin A by the rat intestine in vivo, J. biol. Chem. 236, 349 (1961).
34. GLOVER, J., T. W. GOODWIN, u. R. A. MORTON: Studies in Vitamin A. Conversion in vivo of Vitamin A-aldehyde to Vitamin A, Biochem. J. 43, 109 (1948).
35. GLOVER, J. u. E. R. REDFEARN: The mechanism of the transformation of β -Carotene into Vitamin A in vivo, Biochem. J. 58, XV (1954).
36. FAZAKERLY, F., u. J. GLOVER: The provitamin A-activity of some possible intermediates in β -Carotene-metabolism, Biochem. J. 65, 38 P, (1957).
37. BRÜGGEMANN, J., u. K. H. NIESAR: Der Nachweis eines den Vitamin A-Gehalt der Milch beeinflussenden Faktors im Euter-gewebe des Rindes, Milchwirtschaft 10, 223 (1955).
38. SIBBALD, R., u. L. M. HUTCHINSON: Conversion of β -Carotene to Vitamin A in vivo, Poultry-Sci. 39, 99 (1960).
39. HARASHIMA, K.: Conversion of β -Carotene to Vitamin A by rat intestinal sections, Biochim. biophys. Acta 90, 211 (1964).
40. WEISSBACH, H., F. GOODWIN, u. E. S. MAXWELL: The effect of steroids on aldehyde oxidation, Biochim. biophys. Acta 49, 384 (1961).
41. MAXWELL, E. S., u. Y. J. TOPFER: Steroid-sensitive aldehyde-dehydrogenase from rabbit liver, J. biol. Chem. 236, 1032 (1961).
42. ELDER, T. D., u. Y. J. TOPPER: The oxidation of retinen to Vitamin-A-acid by mammalian steroid sensitive aldehyd-dehydrogenase, Biochim. biophys. Acta 64, 430 (1962).
43. DECKER, K., u. H. UEHLEKE: Die enzymatische Isomerisierung von Lycopin zu β -Carotin, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 323, 61 (1961).
44. WINTERSTEIN, A., u. B. HEGEDÜS: Über das Vorkommen des Retinens in der Natur, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 321, 97 (1960).
45. BRODIE, B. B., J. R. GILETTE, u. B. N. LA DU: Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds, Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958).

46. GAUDETTE, L., u. B. B. BRODIE: Relationship between the lipid solubility of drugs and their oxidation by liver microsomes, *Biochem. Pharmacol.* 2, 89 (1959).
47. ZACHMANN, R. D. u. J. A. OLSON: The uptake of C¹⁴- β -Carotene and its conversion to retinol ester by the isolated perfused rat liver, *J. biol. Chem.* 238, 541 (1963).
48. UDENFRIEND, S., C. T. CLARK, J. AXELROD, u. B. B. BRODIE: Ascorbic acid in aromatic hydroxylation, I. A model system for aromatic hydroxylation, *J. biol. Chem.* 208, 731 (1954).
49. BRODIE, B. B., J. AXELROD, P. A. SHORE, u. S. UDENFRIEND: Ascorbic acid in aromatic hydroxylation, II. Products formed by reaction of substrates with ascorbic acid, ferrous ion and oxygen, *J. biol. Chem.* 208, 741 (1954).
50. ATTENBURROW, J., A. F. CAMERON, J. H. CHAPMAN, R. M. EVANS, B. A. HEMS, A. B. JANSEN, u. T. WALKER: A synthesis of Vitamin A from cyclo hexane, *J. chem. Soc.* 1952, 1094.
51. BIELIG, H. J.: Carotine und A-Vitamine in Hoppe-Seyler, Thierfelder, Bd. 3/2; S. 998.
52. WASICKY, R.: Thin layer chromatography on microslides, *Analyt. Chem.* 34, 1346 (1962).
53. MOORE, T.: Vitamin A, S. 295 Elsevier, Amsterdam (1957).

Lebenslauf

Am 11. August 1937 wurde ich, Klaus Beisenherz, als Sohn des Arztes Dr. Bernhard Beisenherz und seiner Ehefrau Johanna, geb. Meyle, in Schwäbisch Hall geboren.

Von 1943 bis 1948 besuchte ich die Grundschule in Ebersbach/Fils, wo sich mein Vater im Jahre 1938 als praktischer Arzt niedergelassen hatte.

Im Herbst 1948 wechselte ich in das Hohenstaufen-Gymnasium in Göppingen über, an dem ich 1957 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät in Tübingen. Ich habe dort im April 1961 das Physikum abgelegt. Das 1. klinische Semester habe ich ebenfalls in Tübingen belegt. Die folgenden zwei Semester habe ich in Wien studiert, um anschließend wieder nach Tübingen zurückzukehren. Im Herbst 1964 habe ich hier die ärztliche Prüfung abgelegt.

